基础研究

miR-205通过下调ZEB1和ZEB2表达抑制肾小管上皮细胞转分化

曹罗元,杨 菁,富显果,林应华,林 峰,黄宝英
福建医科大学附属宁德市医院中心实验室,福建 宁德 352100

摘要:目的 探讨miR-205在肾小管上皮细胞转分化的作用机制。**方法** 将miR-205 mimics和scrambled control分别转染HK-2转分化细胞株,采用real-time qPCR检测miR-205和ZEB1、E-cadherin、α-SMA mRNA的表达水平;运用Western blotting检测ZEB1、ZEB2、E-cadherin、α-SMA的表达水平。通过细胞免疫组化检测β-catenin的异位表达情况和E-cadherin的表达情况。**结果** miR-205 mimics转染HK-2转分化细胞株后,ZEB1和ZEB2的表达水平较高糖组得到大幅下调(P<0.01),而E-cadherin的表达水平较高糖组显著提高(P<0.01),同时间质细胞特征分子α-SMA的表达水平显著降低(P<0.01)。miR-205 mimics也显著抑制了HK-2转分化过程中β-catenin异位表达,在维持上皮细胞的形态方面也起着重要的作用。**结论** miR-205可通过下调ZEB1和ZEB2的表达,抑制了肾小管上皮间质转分化进程。
关键词:miR-205;转分化;HK-2 细胞株;ZEB1

The MicroRNA miR-205 inhibits epithelial-messenchymal transition in HK-2 cells by down-regulating ZEB1 and ZEB2 expressions

CAO Luoyuan, YANG Jing, FU Xianguo, LIN Yinghua, LIN Feng, HUANG Baoying
Central Laboratory, Ningde Municipal Hospital, Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Ningde 352100, China

Abstract: Objective To explore the role of miR-205 in regulating epithelial-messenchymal transition (EMT) in proximal tubular cell line HK-2 cells and the underlying mechanism. **Methods** HK-2 cells transfected with miR-205 mimics or a scrambled control sequence were examined for miR-205 expressions and mRNA levels of ZEB1, E-cadherin, and α-SMA using real-time qPCR; the protein levels of ZEB1, ZEB2, E-cadherin, and α-SMA were detected with Western blotting. Immunohistochemistry was performed to examine the ectopic expression of β-catenin and E-cadherin expression in the cells. **Results** The expression levels of ZEB1 and ZEB2 decreased significantly (P<0.01) while E-cadherin expression was up-regulated (P<0.01) in cells transfected with miR-205 mimics. Transfection with miR-205 mimics also markedly down-regulated the expression of α-SMA (P<0.01), a marker of mesenchymal cells that play an important role in EMT of HK-2 cells. The ectopic expression of β-catenin was inhibited by miR-205 mimics in HK-2 cells. **Conclusion** miR-205 inhibits EMT in HK-2 cells by down-regulating the expression levels of ZEB1 and ZEB2.
Key words: miR-205; epithelial-messenchymal transition; HK-2 cells; ZEB1

肾小管上皮细胞转分化(epithelial-messenchymal transition, EMT)过程中产生的细胞外基质在肾间质中的积聚是慢性肾纤维化的主要病因[1]。EMT过程涉及上皮细胞经历表型的改变,包括细胞黏性和极性的丧失,获得具有迁移能力的间质细胞特征[2-5],在小鼠肾纤维化过程中,约12%成纤维细胞来源于骨髓,约30%的成纤维细胞则是来源于肾小管上皮细胞的转分化过程[6],而成纤维细胞是转分化过程中产生的细胞外基质的主要成分[7]。波动性高糖能显著促进内皮细胞、心肌细胞的纤维化进程[8]。高糖诱导上皮细胞转分化的可能机制是:高糖导致活性氧的增多,而活性氧通过激活多种生长因子与激素类因子,导致细胞外基质的沉积[9]。本课题组在前期研究中已建立波动高糖诱导肾小管上皮细胞转分化模型,且在实验中也得到了验证[10]。

miRNAs是一类分布广泛而非编码蛋白质的RNAs,一般约含18~24个寡核苷酸,它们不具有开放阅读框,虽然不编码蛋白质,但参与机体各种重要的生理和病理过程;它们通过与靶mRNA 3'UTR(untranslated region)区的碱基互补配对,使其降解或抑制其表达,从而导致特定基因的沉默。miR-21在早期糖尿病肾病中下调表达,过表达miR-21能够抑制模型小鼠系膜细胞的增殖并降低其24 h尿蛋白排泄率[11]。高糖环境中肾

收稿日期:2016-08-13
基金项目:福建省自然科学基金(2012J01435);福建医科大学科技发展专项基金(FZS13022Y);福建省卫计委青年科研课题(2013-1-50)
作者简介:曹罗元,硕士,实验师,E-mail: 278512344@qq.com
通信作者:黄宝英,教授,主任医师,硕士生导师,E-mail: Doctor_hby@aliyun.com

小管上皮细胞miR-29a的表达水平降低,因miR-29a可通过调控胶原Ⅳ型基因转录过程中3'UTR位点,使胶原Ⅳ型蛋白的表达水平得以下调,从而改善肾脏纤维化病情[12]。mir-192的过表达促进了TGF-β1诱导肾脏纤维化进程,而敲除mir-192时则抑制了肾脏纤维化的发展[13]。miR-200a、miR-21、miR-8与Wnt/β-catenin信号途径密切相关[14],miR-146a,miR-145,miR-217在肾纤维化中也发挥重要的作用[15-17]。EMT过程中miR-205表达下降,但ZEB1表达增强了,从而抑制了上皮细胞粘性分子E-cadherin的表达水平,促进了EMT过程的发生和发展进程[18]。miR-200家族(miR-200a, -200b, -200c, -141, -429)和miR-205在EMT过程中表达下调超过100倍[19]。既往研究表明,特异性miRNAs的差异表达在肾小管上皮细胞转分化过程中发挥着重要的作用,但关于mir-205在转分化过程中的调控机制方面尚未见文献报道。通过靶基因扫描,miR-205在ZEB1和ZEB2 3'UTR存在调控结合位点;本研究发现,mir-205可通过下调ZEB1和ZEB2的表达水平以抑制肾小管上皮细胞转分化进程。

1 材料和方法

1.1 材料

人肾近端小管上皮细胞系HK-2购自美国ATCC。Real-time qPCR试剂盒购自TaKaRa公司;培养基D-MEM/F12、胰蛋白酶(Trypsin)、胎牛血清购自Gibco公司,D-glucose购自Sigma公司,脂质体2000购自Thermo公司,DAB显色试剂盒和苏木素染色液购自碧云天生物技术公司。miRNeasy mini试剂盒均购自Qiagen公司。ZEB1、ZEB2、E-cadherin、β-catenin和α-SMA抗体均购自Abcam公司,所用内参和二抗购自santa cruz公司。实时定量PCR引物委托上海吉玛制药技术有限公司合成。

Applied Stepone plus PCR仪购自美国ABI,NanoDrop-1000仪购自德国NanoDrop技术公司,25 cm^2培养瓶和细胞培养板购自美国Corning,研究型倒置显微镜购自日本Olympus。

1.2 细胞培养

HK-2细胞培养于D-MEM/F12培养基中,内含10 %胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素,在37 ℃、5% CO_2孵箱中培养,1~2 d换液,据生长情况用胰酶消化传代。采用波动高糖建立HK-2转分化模型,将生长状态良好的HK-2细胞均匀接种于6孔板中,细胞融合达到60%左右,无血清培养基饥饿培养12 h后,分为正常组和波动高糖组(D-Glucose 5.5 mmol/L与D-Glucose 25 mmol/L交替培养,波动周期为12 h)培养,48 h后进行建模评估,正常组和建模有效组进入后续实验。

1.3 细胞分组和转染

有效建模组分为波动高糖对照组(HG)、阴性对照组(SC, 25 nmol/L scrambled control)、mir-205干预组(MG, 25 nmol/L miR-205-5p mimics),将SC和MG组按照Invitrogen说明书将待转染的miRNA oligomer与脂质体2000均匀混合后,室温静置20 min后滴入各组细胞孔板,6 h后换完全培养基液,以上3组采用波动高糖培养;正常组为D-Glucose 5.5 mmol/L常规培养。所有分组均在37 ℃、5% CO_2培养箱中培养3 d,分别收集48 h和72 h细胞。

1.4 定量PCR检测

各组细胞转染后48 h收集各组细胞,提取细胞总RNA,用分光光度计定量检测RNA质量。先将RNA样品逆转录为cDNA,以cDNA为模板定量样本中miR-205、ZEB1、E-cadherin、α-SMA和GAPDH表达量。miR-205和U6 snRNA采用TaKaRa SYBR PrimeScript™ miRNA RT-PCR Kit,非miRNA组采用TaKaRa SYBR Fast qPCR Mix Kit,各组均采用Applied StepOnePlus Real-Time PCR System进行扩增。采用特异性引物序列见表1。miR-205以U6 snRNA为内参,非miRNA组以GAPDH为内参。根据公式计算目的基因相对含量:$2^{-\triangle\triangle CT}$,即得到各组的相对含量,实验独立重复3次。

表1 实时荧光定量PCR引物

Tab.1 Primers used in real-time qPCR

Genes	Forward Primer	Reverse primer
miR-205	5'CATACCTCCTTCATTCCACCG3'	5'TATGGTTTTGACGACTGTGTGAT3'
U6 snRNA	5'ATTGGAACGATACAGAGAAGATT3'	5'GGAACGCTTCACGAATTTG3'
ZEB1	5'TTCAAACCCATAGTGGTTGCT3'	5'TGGGAGATACCAAACCAACTG3'
E-cadherin	5'CCCACCACGTACAAGGGTC3'	5'ATGCCATCGTTGTTCACTGGA3'
α-SMA	5'GAAGAAGAGGACAGCACTG3'	5'TCCCATTCCCACCATCAC3'
GAPDH	5'ACCCAGAAGACTGTGGATGG3'	5'CAGTGAGCTTCCCGTTCAG3'

1.5 免疫细胞化学检测β-catenin和E-cadherin表达情况

将赖氨酸处理过的无菌盖玻片爬片放于6孔板中，按实验分组处理48 h。细胞用4%的多聚甲醛固定，3% H_2O_2室温孵育10 min灭活内源性过氧化物酶，0.1% Triton X-100孵育20 min，10% BSA封闭。分别加入β-catenin和E-cadherin抗体（1∶50），4 ℃过夜（PBS为阴性对照）。漂洗后滴加二抗（1∶50）孵育2 h，DAB显色，苏木素对比复染、漂洗。Olympus IX71倒置研究型显微镜观察拍照（×400）。

1.6 Western blot检测ZEB1、ZEB2、E-cadherin和α-SMA的表达

分别收集各组培养72 h的细胞，用预冷PBS洗3遍，加入细胞裂解液RIPA和蛋白酶抑制剂，冰浴30 min（每10 min振荡10 s），4 ℃、12 000 r/min离心10 min，提取细胞总蛋白；BCA法测定蛋白浓度。取细胞裂解蛋白30 μg，经10% SDS-PAGE凝胶电泳2 h，PVDF转膜（200 mA、1 h）；5%脱脂奶粉封闭PVDF膜2 h，分别加入E-cadherin、α-SMA、ZEB1和ZEB2抗体，4 ℃过夜，洗膜后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体或羊抗小鼠抗体（1∶5000稀释），37 ℃孵育1 h；洗膜后加ECL试剂，然后将PVDF膜放入Bio-Rad化学发光成像系统中成像，每组实验独立重复3次。所得免疫印迹通过Image J软件获得各实验组与内参灰度值的比值。

1.7 统计学分析

实验数据以均数±标准差表示，用SPSS 13.0软件进行方差分析，以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 波动高糖诱导HK-2细胞转分化模型建立

HG组中的细胞形态变为具有间质细胞形态的梭形（图1），E-cadherin表达水平大幅降低，α-SMA表达水平显著提高（图2,4），同时细胞核中的β-catenin的异位表达水平明显增强（图3），说明HK-2细胞经波动高糖培养建立HK-2转分化模型是成功的。

2.2 miR-205对维持HK-2内皮细胞形态的作用

实验各组HK-2细胞培养72 h，通过倒置显微镜观察细胞形态，发现HG组细胞较NG组发生明显形态改变，NG组细胞为椭圆形的形态，为正常内皮细胞细胞；而HG组细胞转变为具有间质细胞形态的梭形，但MG组梭形细胞较HG组和NC组的比例明显下降（图 1）。说明miR-205 mimics对维持HK-2内皮细胞形态具有积极的作用。

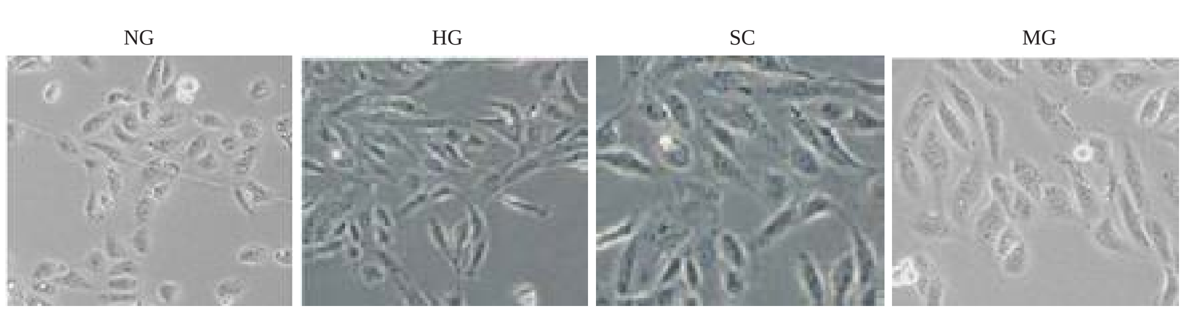


图1 各组细胞形态改变

Fig.1 Morphological changes of HK-2 cells with different treatments (Original magnification: ×400). NG group: Cells cultured in 5.5 mmol/L D-glucose; HG group: Cells exposed intermittently to high glucose (25 mmol/L D-glucose); SC group: Cells exposed intermittently to high glucose and transfected with 25 nmol/L scrambled control; MG group: Cells exposed intermittently to high glucose and transfected with 25 nmol/L miR-205 mimics.

2.3 miR-205 mimics对ZEB1、E-cadherin和α-SMA mRNA的影响

通过targetscan靶点扫描，获得miR-205在转分化过程中潜在的作用靶点为ZEB1和ZEB2，ZEB1和ZEB2在转分化过程中是E-cadherin的转录抑制因子。通过实时荧光定量PCR检测，如图2C所示，HG组的E-cadherin mRNA相对表达量较NG组显著下降（$P<0.01$），而且HG组α-SMA mRNA相对表达较NG组显著增强（$P<0.01$），符合HK-2细胞在转分化过程中所具有的特性。HG组miR-205的相对表达量较NG组大幅下降（$P<0.01$），MG组中miR-205相对表达量较HG组显著提高（$P<0.01$）（图 2B）。同时，MG组中ZEB1 mRNA相对表达量较HG组有显著下降（$P<0.01$），E-cadherin mRNA相对表达量较HG组显著提高（$P<0.01$），而α-SMA mRNA相对表达量较HG显著下降（$P<0.01$）。这说明HK-2细胞在转分化过程中，miR-205对转分化进程发挥着重要的作用，而且增强miR-205的表达有利于抑制HK-2细胞的转分化过程。

2.4 miR-205 mimics抑制β-catenin异位表达和维持上皮细胞极性

如图3细胞免疫组化结果所示，波动高糖HG组中的β-catenin的表达聚集在细胞核中，E-cadherin的表达

A

targetscan		Predicted consequential pairing of target region (top) and mRNA (bottom)
Position 817-824 of Zeb1 3' UTR	5'	...AAUAUGUGGUAACAUAUGAAGGA...
hsa-miR-205-5p	3'	GUCUGAGGCCACCUUACUUCCU
Position 561-567 of Zeb2 3' UTR	5'	...UUUUUUUUUUUUUCUGUGAAGGAA...
hsa-miR-205-5p	3'	GUCUGAGGCCACCUUACUUCCU
Position 622-628 of Zeb2 3' UTR	5'	...AAAGUGACCUGGACGUGAAGGAA...
hsa-miR-205-5p	3'	GUCUGAGGCCACCUUACUUCCU

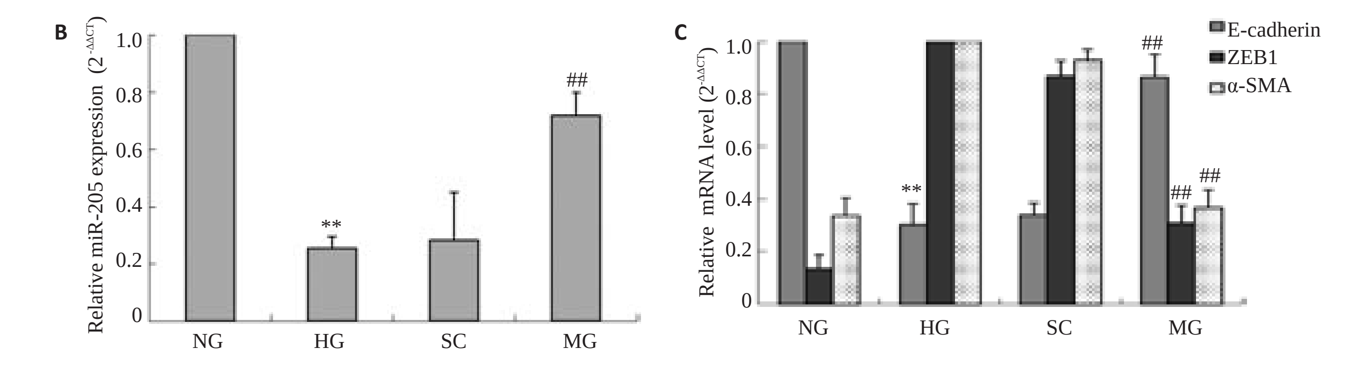


图2 miR-205对ZEB1、E-cadherin和α-SMA mRNA的影响

Fig.2 Effects of miR-205 on ZEB1, E-cadherin and *α*-SMA mRNA expressions in HK-2 cells. ***A***: Targetscan analysis of the 3'UTR of the ZEB1 and ZEB2 genes, which contain binding sites for miR-205; ***B***: Relative miR-205 expression; ***C***: Effects of miR-205 mimics on ZEB1, E-cadherin and *α*-SMA mRNA in HK-2 cells. $^{**}P<0.01$ *vs* NG group; $^{\#\#}P<0.01$ *vs* HG group.

量较NG组明显下降，符合上皮细胞转分化的特性。但通过miR-205 mimics的干预，MG组的β-catenin表达量得到明显下降，同时增强了E-cadherin的表达。说明miR-205在肾小管上皮细胞向间质细胞转分化过程中，参与了抑制β-catenin的异位表达，对抑制E-cadherin表达下降也发挥着重要的作用。

2.5 miR-205通过下调ZEB1和ZEB2抑制HK-2细胞转分化过程

HG组细胞转染miR-205 mimics后，维持了HK-2上皮细胞椭圆形的细胞形态（图1），增强了上皮细胞粘性重要分子E-cadherin的表达水平（图2,4），降低了间质细胞特征分子α-SMA的表达水平（图2,4），同时MG组ZEB1和ZEB2的表达量较HG组也得到大幅下调（图2,4）。

ZEB1和ZEB2是上皮细胞向间质细胞转分化过程中E-cadherin的转录抑制因子，提高ZEB1和ZEB2的表达水平，可抑制E-cadherin的表达。本研究发现，通过miR-205 mimics提高miR-205的水平，可显著抑制ZEB1和ZEB2的表达水平（图2,4），促进了E-cadherin的表达，从而抑制了HK-2细胞转分化的过程。

3 讨论

miRNAs与靶mRNA的3'UTR区的碱基互补配对而起作用，使其降解或抑制其表达，从而导致特定基因的沉默，对机体生长、发育及各种疾病尤其是肿瘤的发生和发展具有重要的调节功能。它们调节了多种生物学信号通路，生物信息学数据显示，每个miRNA可以调节数百个靶基因，这也表明miRNAs可能影响所有的信号途径。如在先天性梗阻性肾病肾小鼠上皮细胞中miR-205的逐步增加与肾积水的严重程度呈现正相关[20]。同时，miR-205可通过调控SMAD2/SMAD7参与TGF-β1信号途径的调控过程[21]，miR-205在造血细胞中有致癌基因的作用[22]，而在骨肉瘤中发挥着肿瘤抑制基因功能[23]。miR-205和Krüppel样因子具有作为诊疗基底样乳腺癌的生物学标记分子的潜能[24]，miR-205也可作为乳腺癌和炎性乳腺癌的治疗学靶点[25]。这些研究说明，miR-205在EMT和肿瘤发生过程中发挥着重要的作用，深入研究miR-205功能对相关疾病的诊疗具有重要临床指导意义；但关于miR-205在肾纤维化过程中的功能研究尚未见文献报道。

本研究中，通过targetscan进行miR-205靶基因扫描，发现ZEB1 3'UTR 817-824区域和ZEB2 3'UTR 561-567/622-628区域有miR-205的结合位点。ZEB1和ZEB2是E-cadherin的转录抑制因子，而E-cadherin在上皮细胞EMT过程中发挥着重要的作用，是具有维持上皮细胞粘性和极性的作用[2-4]，也是上皮细胞EMT

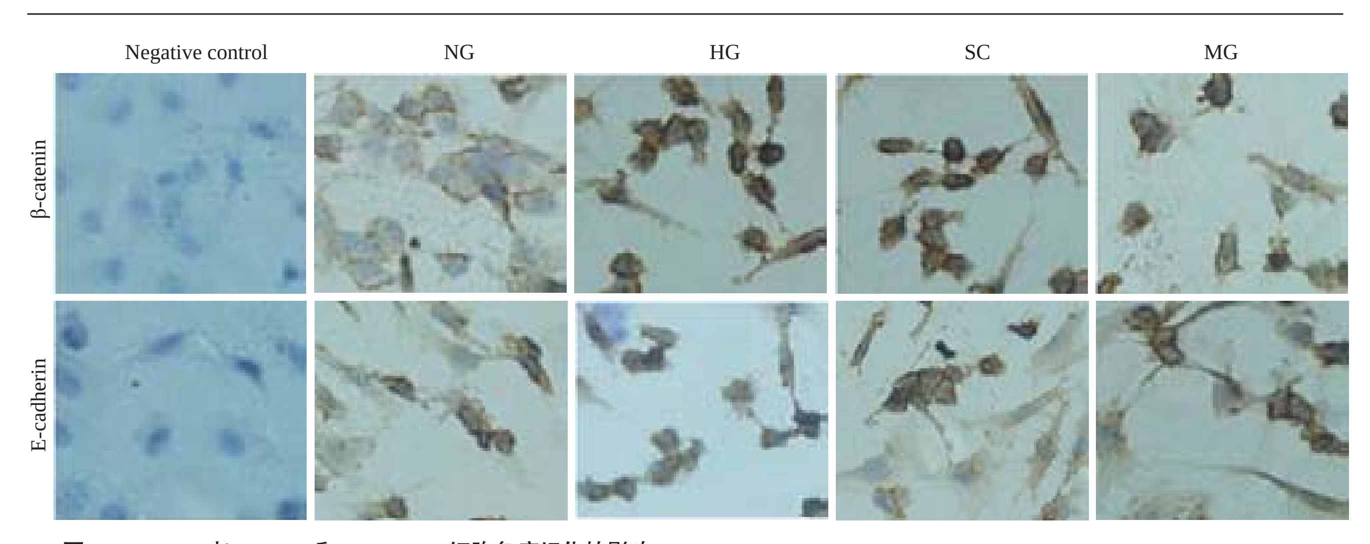
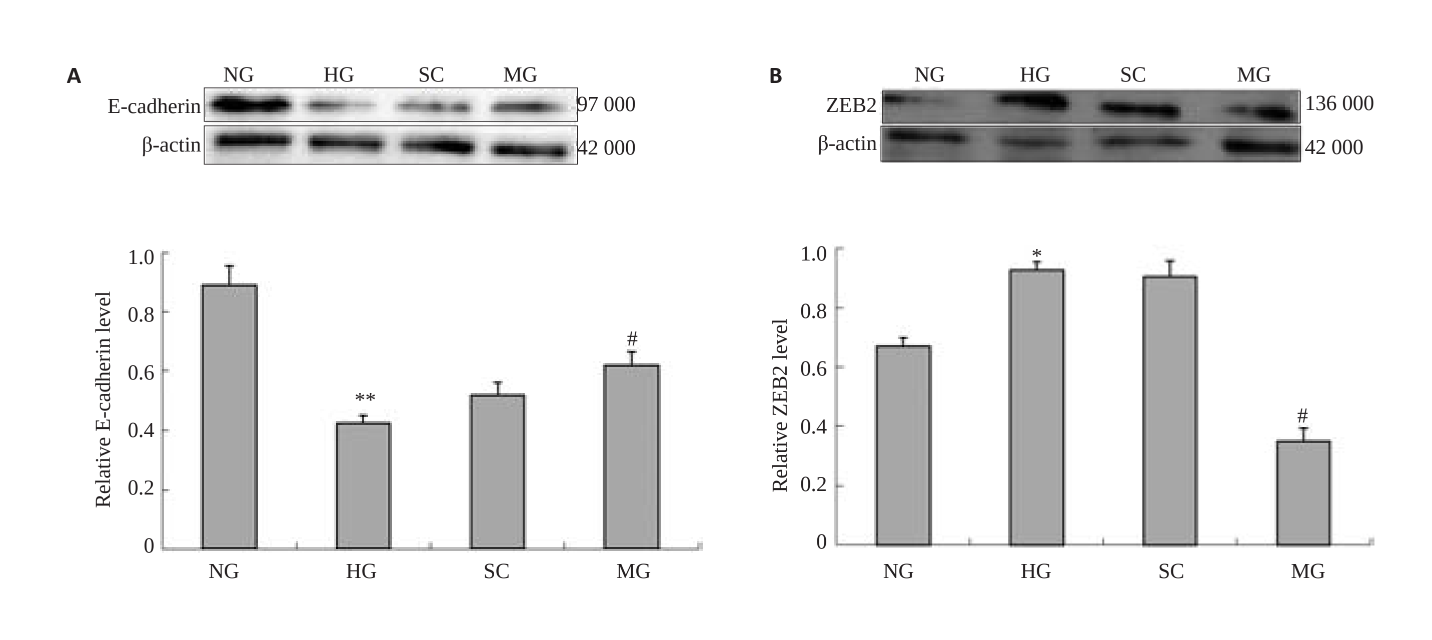


图3 miR-205对β-catenin 和E-cadherin细胞免疫组化的影响

Fig.3 Effects of miR-205 on β-catenin and E-cadherin expressions in HK-2 cells (immunocytochemistry, ×400).



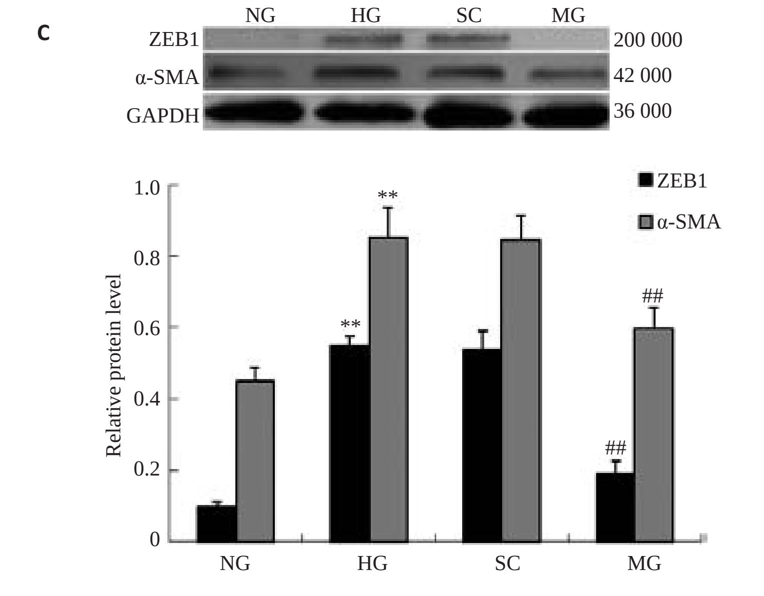


图 4 各组 ZEB1、ZEB2、E-cadherin 与 α-SMA 的相对表达情况

Fig.4 Relative protein expression levels of ZEB1, ZEB2, E-cadherin and α-SMA in HK-2 cells. *A*: Expression level of E-cadherin; *B*: Expression level of ZEB2; *C*: Expression levels of ZEB1 and α-SMA. *P<0.05, **P<0.01 *vs* NG group; #P<0.01, ##P<0.01 *vs* HG group.

过程的标志性分子。HG组细胞分别转染scrambled control和miR-205 mimics后，SC组的各项指标未发现与HG组有统计学意义。MG组中ZEB1和ZEB2的表达水平较HG组得到大幅下调(P<0.01)，而E-cadherin的表达水平较HG组显著提高(P<0.01)，同时间质细胞特征分子α-SMA的表达水平显著降低(P<0.01)(图2，4)。miR-205 mimics也显著抑制了MG组中β-catenin异位表达(图3)，在维持上皮细胞的形态方面也起着重要的作用(图1)。

研究表明，miR-200家族的调控靶点都是ZEB1和ZEB2，它们抑制许多上皮细胞的基因表达，其中也包括了E-cadherin[26]。也有研究证实过表达miR-205可以修复E-cadherin的表达[27]。本研究发现，通过miR-205 mimics抑制ZEB1和ZEB2的表达，也可促进E-cadherin在抑制HK-2细胞转分化过程中的表达修复。

肾纤维化早期临床病症不明显，不易被检出，因此，探寻一个无创伤性、易于连续监测且能准确反映肾纤维化进程的客观评价指标是肾纤维化早期诊断和防治CKD的关键。miRNAs分子表达水平的变化先于疾病的发生，而且miRNAs的表达具有组织特异性，疾病状态下miRNAs出现差异表达，这为miRNAs作为肾纤维化诊断指标奠定了理论基础；而近年来的研究进一步验证了miRNAs作为疾病诊断的可能性和可行性[24-25, 28-30]。

本文通过miR-205 mimics对HK-2细胞转分化过程中潜在靶点进行研究，表明miR-205的过表达，通过与ZEB1和ZEB2 3'UTR特异位点结合，下调了ZEB1和ZEB2的表达，抑制了肾小管上皮间质转分化。综上，miR-205可通过下调ZEB1和ZEB2的表达，以抑制肾小管上皮细胞转分化进程，为肾间质纤维化的治疗提供了新的靶点。后续将探究肾纤维化患者体液中miR-205的差异表达情况，探寻无创途径的肾纤维化早期临床诊断方法，这将给临床实践中肾纤维化早期诊断提供科学依据与实践基础。

参考文献:

[1] Liu YH. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2011, 7(12): 684-96.

[2] Lovisa S, Zeisberg M, Kalluri R. Partial Epithelial-to-Mesenchymal transition and other new mechanisms of kidney fibrosis[J]. Trends Endocrinol Metab, 2016, 27(10): 681-95.

[3] Stone RC, Pastar I, Ojeh N, et al. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis[J]. Cell Tissue Res, 2016, 365(3): 495-506.

[4] Xu MH, Gao X, Luo D, et al. EMT and acquisition of stem cell-like properties are involved in spontaneous formation of tumorigenic hybrids between lung cancer and bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e87893.

[5] Ravikrishnan A, Ozdemir T, Bah M, et al. Regulation of Epithelial-to-Mesenchymal transition using biomimetic fibrous scaffolds[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8: 17915-26.

[6] Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis[J]. J Clin Invest, 2003, 112(12): 1776-84.

[7] Lebleu VS, Taduri G, O'connell J, et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis [J]. Nat Med, 2013, 19(8): 1047-53.

[8] Fragiadaki M, Mason RM. Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis-evidence for and against[J]. Int J Exp Pathol, 2011, 92 (3): 143-50.

[9] Carew RM, Wang B, Kantharidis P. The role of EMT in renal fibrosis[J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(1): 103-16.

[10] 曹罗元, 黄宝英, 富显果, 等. 波动性高糖对肾小管上皮细胞Wnt/β-catenin信号途径的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(7): 690-4.

[11] Zhang Z, Peng H, Chen J, et al. MicroRNA-21 protects from mesangial cell proliferation induced by diabetic nephropathy in db/db mice[J]. FEBS Lett, 2009, 583(12): 2009-14.

[12] Du B, Ma LM, Huang MB, et al. High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells[J]. FEBS Lett, 2010, 584(4): 811-6.

[13] Krupa A, Jenkins R, Luo DD, et al. Loss of MicroRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(3): 438-47.

[14] Huang K, Zhang JX, Han L, et al. MicroRNA roles in beta-catenin pathway[J]. Mol Cancer, 2010, 9(1): 252.

[15] Morishita Y, Imai T, Yoshizawa HA, et al. Delivery of microRNA-146a with polyethylenimine nanoparticles inhibits renal fibrosis *in vivo*[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10: 3475-88.

[16] Mclendon JM, Joshi SR, Sparks J, et al. Lipid nanoparticle delivery of a microRNA-145 inhibitor improves experimental pulmonary hypertension[J]. J Control Release, 2015, 210: 67-75.

[17] Han F, Konkalmatt P, Chen JH, et al. miR-217 mediates the protective effects of the dopamine D2 receptor on fibrosis in human renal proximal tubule cells [J]. Hypertension, 2015, 65(5): U856-1118.

[18] Paterson EL, Kolesnikoff N, Gregory PA, et al. The microRNA-200 family regulates epithelial to mesenchymal transition[J]. Sci World J, 2008, 8: 901-4.

[19] Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The mir-200 family and mir-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1[J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(5): 593-601.

[20] Wilhide ME, Feller JD, Li BR, et al. Renal epithelial miR-205 expression correlates with disease severity in a mouse model of congenital obstructive nephropathy [J]. Pediatr Res, 2016, 80(4): 602-9.

[21] Duan YJ, Chen QX. TGF-beta 1 regulating miR-205/miR-195 expression affects the TGF-beta signal pathway by respectively targeting SMAD2/SMAD7[J]. Oncol Rep, 2016, 36(4): 1837-44.

[22] Jang SJ, Choi IS, Park G, et al. MicroRNA-205-5p is upregulated in myelodysplastic syndromes and induces cell proliferation *via* PTEN suppression[J]. Leuk Res, 2016, 47: 172-7.

(下转1711页)

Am Coll Cardiol, 2005, 45(4): 599-607.

[11] Hamid SA, Bower HS, Baxter GF. Rho kinase activation plays a major role as a mediator of irreversible injury in reperfused myocardium[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(6): H2598-606.

[12] 叶红伟, 康品方, 王洪巨, 等. 乙醛脱氢酶2在法舒地尔心肌保护作用中的机制探讨[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(5): 1070-2.

[13] 董淑英, 童旭辉, 刘 浩, 等. 石榴多酚对心肌缺血/再灌注损伤大鼠心功能的保护作用[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(7): 924-7.

[14] 赵 亮, 李 芝, 钱令波, 等. 海州香薷总黄酮对大鼠离体心脏缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2014, 30(2): 161-5.

[15] Chen C, Hu LX, Dong T, et al. Apoptosis and autophagy contribute to gender difference in cardiac ischemia-reperfusion induced injury in rats[J]. Life Sci, 2013, 93(7): 265-70.

[16] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et al. The beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(4): 571-80.

[17] Vij A, Randhawa R, Parkash J, et al. Investigating regulatory signatures of human autophagy related gene 5 (ATG5) through functional in silico analysis[J]. Meta Gene, 2016, 9: 237-48.

[18] Cao L, Fu M, Kumar S, et al. Methamphetamine potentiates HIV-1 gp120-mediated autophagy via Beclin-1 and Atg5/7 as a pro-survival response in astrocytes[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(10): e2425.

[19] Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes[J]. J Biol Chem, 2006, 281(40): 29776-87.

[20] Wang Y, Shen J, Xiong X, et al. Remote ischemic preconditioning protects against liver Ischemia-Reperfusion injury via Heme oxygenase-1-Induced autophagy[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98834.

[21] 邱晓晓, 戴雍月, 宋张娟, 等. SP600125对大鼠肺缺血/再灌注损伤的保护作用及机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2012, 28(3): 255-8.

[22] 王洪巨, 康品方, 叶红伟, 等. 乙醛脱氢酶2在糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤中的抗凋亡作用[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(3): 345-8.

[23] Zhang WP, Zong QF, Gao Q, et al. Effects of endomorphin-1 postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury and myocardial cell apoptosis in a rat model[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4): 3992-8.

（编辑：经 媛）

（上接1705页）

[23] Zhang C, Long F, Wan J, et al. MicroRNA-205 acts as a tumor suppressor in osteosarcoma via targeting RUNX2[J]. Oncol Rep, 2016, 35(6): 3275-84.

[24] Guan B, Li Q, Li XH, et al. MicroRNA-205 targeted Krüppel-like factor 12 and regulated MDA-MB-468 cells apoptosis in basal-like breast carcinoma[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2016, 96(26): 2070-5.

[25] Huo L, Wang Y, Gong Y, et al. MicroRNA expression profiling identifies decreased expression of miR-205 in inflammatory breast cancer[J]. Mod Pathol, 2016, 29(4): 330-46.

[26] Vandewalle C, Van Roy F, Berx G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(5): 773-87.

[27] Hurteau GJ, Carlson JA, Spivack SD, et al. Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin[J]. Cancer Res, 2007, 67(17): 7972-6.

[28] Wang G, Kwan BC, Lai FM, et al. Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: novel biomarkers of fibrosis[J]. Am J Nephrol, 2012, 36(5): 412-8.

[29] Yamada Y, Enokida H, Kojima S, et al. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology[J]. Cancer Sci, 2011, 102(3): 522-9.

[30] Lv LL, Cao YH, Ni HF, et al. MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 305(8): F1220-7.

（编辑：吴锦雅）